

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к производству биологических инсектицидов для лесного хозяйства.

Известен штамм вируса ядерного полиэдроза непарного шелкопряда S-13-р, который используется при производстве вирусного инсектицида Вирин-ЭНШ и получен путем адаптации вируса ядерного полиэдроза ивового шелкопряда к непарному шелкопряду (Итоги и перспективы производства и применения вирусных препаратов в сельском и лесном хозяйстве: Сб. - М, 1984. - С.3 - 14).

Недостатком данного штамма является то, что он имеет низкую биологическую активность. Кроме того, штамм имеет узкую видоспецифичность и препарат на его основе неэффективен, в частности, для обыкновенного соснового пилильщика.

Известен штамм вируса ядерного полиэдроза Pd-1 - 5 для производства инсектицидного препарата, полученный путем отбора из природного изолята вируса, выделенного обычными методами из большой гусеницы непарного шелкопряда (Авторское свидетельство СССР №1638161, кл. C12N7/00).

Данный штамм наиболее близок к заявляемому по технической сущности и достигаемому результату.

Штамм-прототип устраняет недостаток аналога, связанный с низкой биологической активностью. Однако, как и аналог, штамм-прототип имеет узкую видоспецифичность, поэтому инсектицидный препарат на его основе мало эффективен для борьбы, в частности, с обыкновенным сосновым пилильщиком.

В основу изобретения поставлена задача получения штамма вируса ядерного полиэдроза для производства инсектицидного препарата, который имел бы более высокую вирулентность по отношению к обыкновенному сосновому пилильщику.

Новый штамм Ва-1 получен путем отбора из природного изолята вируса, выделенного традиционными методами из больных личинок обыкновенного соснового пилильщика, которые были обнаружены заявителем в Васищевском лесничестве Октябрьского гослесхоза Харьковской области.

Способ выделения нового штамма включает в себя следующие этапы:

1. Личинки обыкновенного соснового пилильщика, которые погибли от вироза, растирают в фарфоровой ступке с дистиллированной водой, а затем размешивают на магнитной мешалке в течение 2 - 3 суток с целью вымывания вирусных полиэдров из тканей погибших личинок.

2. Полученную суспензию фильтруют; первый раз через ватномарлевый фильтр, потом дважды через капроновый фильтр с отверстиями диаметром 0,1мм.

3. Полученный фильтрат центрифугируют в течение двух часов при нагрузке 9000g. Супернатант сливают, осадок собирают, тщательно гомогенизируют до получения однородной массы.

4. Наличие полиэдров, а также их концентрацию определяют с помощью способа Гимзе - окрашивания нативных мазков бриллиантовой зеленью и просмотра мазков при увеличении в 1350 раз в поле зрения объектива с масляной имерсией.

Отбор материала проходил в пяти повторностях с разных участков лесонасаждения. После выделения штамма, полученный изолят вируса испытывался на различных популяциях (по местонахождению) обыкновенного соснового пилильщика - Херсонской, Волчанской, Николаевской, Очаковской для определения вирулентности данного штамма.

Штамм вируса Ва-1 был передан на хранение и проведение медико-токсикологического анализа в УкрНИИ эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского.

Полученный штамм вируса ядерного полиэдроза имеет следующие морфологическую и физиологическую характеристики.

Морфологическая характеристика: штамм Ва-1 относится, согласно классификации вирусов принятой в 1966г. в Москве на IX международном микробиологическом конгрессе Международным комитетом таксономии вирусов, к семейству бакуловирусов (Baculoviridae), группа (или род) *Baculovirus*, подгруппа А; вирусы, вызывающие ядерный полиэдроз у насекомых (Polyhedrovirus), видовое название *Nucleopolyhedrosis virus Diprion pini* L.

Палочковидные вирионы размером до 50 × 250нм расположены в полиморфных белковых матриксах - полиэдрах поодиночке и беспорядочно. Размер полиэдров 0,3 - 0,9мкм. Полиэдры не имеют четких границ и близки к шарообразной форме (гексатетраэдрический класс изометрической сингонии). В среднем в каждом полиэдре содержится до 11шт. вирусных частиц.

Вирион окружен двумя мембранами, внешняя мембрана толщиной около 75Å, внутренняя - около 60Å. Расстояние между мембранами составляет около 40Å.

Внутренняя мембрана тождественная капсиду, составляющему внешний белковый слой вириона. Сердцевина вирусной частицы состоит из электронно-плотной зоны шириной около 60Å содержащей ДНК, которая имеет спиральную структуру.

Криптограмма вируса ядерного полиэдроза обыкновенного соснового пилильщика:

D/2 : 80/8 - 15 : 0/E : 1/0,

где D/2 - вирус содержит ДНК и она двунитчатая;

80млн - молекулярный вес ДНК;

8 - 15% - содержание ДНК;

0 - вирион округлой формы, палочковидный;

Е - нуклеокапсид продолговатый с параллельными сторонами и незакругленными углами;

1 - систематическая принадлежность инфицируемого хозяина - /Invertebrate/ беспозвоночное/;

0 - переносчик неизвестен.

Физиологические признаки:

Штамм Ва-1 культивируется в личинках обыкновенного соснового пилильщика, зараженных путем скармливания естественного корма хвои сосны, инфицированного вирусом.

При заражении личинок по достижении ими 3-возрастной стадии хвойную лапку опрыскивают водной суспензией полиэдров с титром 1×10^6 .

Инкубационный период заболевания составляет 8 - 10 дней. Вирус репродуцируется в тканях

кишечника. Оптимальная температура для репродукции вируса $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Рекомендуется хранить штамм при температуре от -12° до -70°C .

Выход вирусных полиэдров из одной личинки IV возраста составляет $7,7 \times 10^8$ полиэдров.

Устойчивость к воздействию внешних факторов: вирус ядерного полиэдроза устойчив к экстремальным факторам при сохранении элементарных вирусных частиц в белковом матриксе, то есть в полиэдре, который надежно защищает вирус от инактивации. Вирусные включения теряют биологическую активность под воздействием ультрафиолетовых лучей (вирус полностью инактивируется за 5,5 часов).

Если с помощью химических веществ разрушать белковый матрикс (полиэдр), то освобожденные вирусные частицы быстро теряют активность. Также инактивация вируса происходит при температуре выше 55°C .

Сохраняемые при комнатной температуре на протяжении 4 - х лет полиэдры сохраняли высокие показатели вирулентности, которая существенно снижается к 9 - 10 году хранения.

После внесения вируса в сосновые насаждения, он сохраняет активность на протяжении 25 - 30 дней, а потом вирулентность начинает постепенно снижаться под влиянием инсоляции.

Характеристики штамма Ва-1 и известного штамма Рд-1 - 5 приведены в таблице.

Как видно из таблицы, биологическая активность предлагаемого штамма выше, чем биологическая активность прототипа. При заражении гусениц непарного шелкопряда штаммом Ва-1 вируса обыкновенного соснового пилильщика инфицирования не наблюдалось и наоборот, Рд-1 - 5 не инфицирует личинок обыкновенного соснового пилильщика. Норма расхода препарата на основе предлагаемого штамма в два раза ниже.

Сущность изобретения поясняется следующим конкретным примером использования штамма Ва-1.

Пример. Партию личинок обыкновенного соснового пилильщика по достижении ими 3-возрастной стадии инфицировали штаммом Ва-1 вируса ядерного полиэдроза. Корм опрыскивали вирусной суспензией с титром 1×10^6 полиэдров в 1мл. Через 10 дней проводили сбор инфицированных личинок.

Погибших личинок собирали и гомогенизировали до получения однородного гомогената, который затем мацерировали в течение 2 - х дней. После этого жидкость фильтровали, фильтрат центрифугировали и полученный осадок после определения титра разводили глицерином и водой.

Полученный инсектицид (Вирин-ОСП) представляет собой суспензию полиэдров вируса ядерного полиэдроза с 50% - ным глицерином.

Препарат легко и равномерно ресуспендируется в воде. Стойкость при хранении обеспечивается в течение трех лет.

Препарат Вирин-ОСП на основе штамма Ва-1 является экологически чистым, обладает избирательным действием только к целевому насекомому - обыкновенному сосновому пилильщику. Препарат безопасен для теплокровных животных и человека.

Таким образом, штамм Ва-1 позволяет получить инсектицид, который патогенен для личинок *Diprion pini* L и обладает высоким избирательным действием, инфицируя только личинки обыкновенного соснового пилильщика.

Таблица

	Биологическая активность штаммов (ЛК ₅₀)	
	Рд-1-5	Ва-1
Непарный шелкопряд	$0,2 \times 10^5$	0
Обыкновенный сосновый пилильщик	0	$0,35 \times 10^5$
Норма расхода препарата на основе штамма, г/га	100-150	50-80